Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Hochschule Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Keller

Eignet sich die Trockenmilchserum-Reaktion auf Tuberkulose und Brucellose für Reihenuntersuchungen?

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Hochschule

zu

Gießen

eingereicht von

Karl Rödder
Tierarzt aus Eichelhardt (Kreis Altenkirchen)

Gießen 1952
Buchdruckerei Richard Glagow

LANE MEDICAL LIBRARY
SAN FRANCISCO

Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Hochschule Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Keller

Eignet sich die Trockenmilchserum-Reaktion auf Tuberkulose und Brucellose für Reihenuntersuchungen?

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Hochschule

zu

Gießen

eingereicht von

Karl Rödder
Tierarzt aus Eichelhardt (Kreis Altenkirchen)

Gießen 1952
Buchdruckerei Richard Glagow

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät Gießen

Dekan: Prof. Dr. Hemmert-Halswick
Berichterstatter: Prof. Dr. Keller

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 1952

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung 5
B. Schrifttum 6
C. Eigene Untersuchungen
I. Untersuchungsmaterial 10
II. Trockenmilchserum-Reaktion auf Tuberkulose . . . 10
III. Technik und Durchführung der Trockenmilch-Reaktion auf Brucellose 12
IV. Untersuchnng auf Brucellose mit der Langsam-Agglutination 14
V. Untersuchungsergebnisse 15
a) Auswertung der Tabellen 15
b) Zusammenfassung 16
VI. Schlußbetrachtung 17
VII. Literaturverzeichnis 18

A. Einleitung.

Die Rindertuberkulose ist zur Zeit die Tierseuche, welche Tierärzte und Landwirte vor schwerwiegende Probleme stellt. Hierbei handelt es sich nicht allein um die wirtschaftlichen Schäden, die von Weyl (28) mit 350 Millionen Reichsmark für das Jahr 1937 angegeben werden, sondern auch um die hygienischen, da in zahlreichen Fällen die tuberkulösen Erkrankungen des Menschen bovinen Ursprungs sind (Wagner, 26).

Die Bekämpfung der Tuberkulose gestaltete sich deshalb schwierig, weil durch die Ungunst der Verhältnisse gerade in der letzten Zeit (Kriegs- und Nachkriegszeit) außerordentliche Schwierigkeiten bestanden, beispielsweise in der Ernährungslage, welche der schnellen Ausbreitung dieser Infektionskrankheit bei Mensch und Tier Tür und Tor öffneten.

Die Übertragung der Tuberkulose vom Rind auf den Menschen geschieht u. a. vornehmlich durch infizierte Lebensmittel, wobei die Milch die hauptsächlichste Rolle spielt. Durch die Pasteurisierung der Milch in den Molkereien soll die Gefahr der Infektion gebannt werden. Jedoch bietet auf Grund der Veröffentlichungen von Wagner (zit. nach Weyl, 28; Munz, 19; Schönberg, 24; Eikmeier, 9; Blindow, 2 und Grüll, 10) auch die Pasteurisierung nicht immer die Gewähr dafür, daß die durch Molkereien behandelte Milch frei von virulenten Tuberkelbakterien ist Um Schwankungen in der Erhitzungstemperatur unwirksam zu machen, ist man deshalb in neuerer Zeit bemüht, automatische Umschaltvorrichtungen in die vom Erhitzer führenden Leitungen einzubauen, welche bei Nichterreichen der vorgeschriebenen Temperatur die Milch in den Sammelbehälter zurückfließen lassen.

Wenn daher heute die Länderregierungen und die Landwirtschaft versuchen, die Tuberkulose zu tilgen, so ist es erforderlich, daß von tierärztlicher Seite alle zur Diagnostik der Tuberkulose geeigneten Verfahren angewandt werden und eine ausführliche Beratung der Tierbesitzer erfolgt, damit nicht durch das Neuauftreten von Reagenten in bereits sanierten Beständen empfindliche Verluste eintreten.

Auch die Brucellose gewinnt ständig mehr an Bedeutung, da sie nicht nur einen großen wirtschaftlichen Schaden verursacht, sondern — wie die Tuberkulose — eine Infektionsgefahr für den Menschen darstellt.

Nach Schönberg (24) sind im Mittel etwa 30 % der Bestände — 0,67 bis 28,48 % der Rinder — mit Brucella abortus infiziert und in den Jahren 1938 und 1939 amtlich 600 bzw. 416 Erkrankungen beim Menschen bekannt geworden. Vornehmlich stammten die Erkrankten aus der Land- und Milchwirtschaft.

Herr Professor Dr. Keller hat mich beauftragt, im Rahmen dieser Dissertation die Trockenmilchserumreaktion auf ihre Anwendbarkeit zur Diagnose der Tuberkulose und Brucellose im Rahmen einer Durchuntersuchung der Milchbestände der Gemeinde H. zu überprüfen.

B. Schrifttum.

In Amerika wendet man seit 1917 zur Tilgung der Rindertuberkulose das sogenannte „Stamping-out"-Verfahren an (16). Als Diagnostikum dient dort die intrakutane Tuberkulinprobe. Alle reagierenden Tiere werden durch sofortige Schlachtung ausgemerzt. Bei einem geringen Verseuchungsgrad von 4 % war dieses Verfahren anwendbar, aber man brauchte trotzdem auf diese Weise 30 Jahre, um die Tuberkulose von 4 % auf 0,2 % zu senken (zitiert nach Weyl, 28).

Das dänische Verfahren ermittelt ebenfalls durch die intrakutane Tuberkulinprobe die Infektionsträger und fordert die Abschlachtung aller positiv reagierenden Tiere, sofern es wirtschaftlich tragbar ist. Eine wirtschaftliche Weiterbenutzung ist nur unter vollständiger Trennung von den gesunden Tieren erlaubt. Auch Dänemark konnte so in rund 40 Jahren eine fast vollkommene Tilgung erreichen.

Da in Deutschland eine weit hochgradigere Verseuchung besteht, muß man sich wohl vorerst damit begnügen, durch enge Zusammenarbeit zwischen Tierarzt und Landwirtschaft auf lange Sicht Bestand nach Bestand zu sanieren.

Auch in Deutschland hat sich die Intrakutanprobe als die sicherste Methode erwiesen. Wirth-Diernhofer (29) bezeichnen die einwandfrei ausgeführte Probe bei ihrem positiven Ausfall als unbedingt zutreffend.

Nach Rolle (21) besagt die Erfahrung, daß durch eine wiederholte Intrakutanprobe nach 2—7 Tagen, bei vorher zweifelhaftem oder negativem Ergebnis, etwa 20 % mehr tuberkulöser Tiere erfaßt werden können, als mit der einmaligen Tuberkulinprobe. Nach Weyl (28) soll die Wiederholungsprobe nach 3—4 Wochen vorgenommen werden.

Dies wird in einem Referat (Tuberculin and the Control of the Bovine Tuberbulosis, 31) bestätigt. Durch die doppelte Tuberkulinprobe werden über 15 % mehr infizierte Tiere als durch die einmalige Tuberkulinprobe erfaßt. In diesem Referat wird darauf hingewiesen, daß ein geringer Prozentsatz von 1,66 % tuberkulös-infizierter Tiere nicht auf die Tuberkulinisierung anspricht.

Daß bei einer einmal durchgeführten Intrakutanprobe die Zahl der erfaßten Reagenten geringer ist als bei der nach Rolle (21) wiederholten Tuberkulinisierung, schreibt auch Buß (5). Seelemann und Pilz (22) verweisen ebenfalls auf die Tatsache, daß die Tuberkulinprobe in einem bestimmten Prozentsatz der Fälle versagt. Schoop (25) schreibt hierzu: „Tatsächlich sehen wir darüber hinaus die Anergie nicht selten losgelöst vom Resistenzniederbruch. Sie betrifft im Gegenteil vielfach Tiere, die sich in

der besten Zucht- und Milchkondition befinden. Klinisch läßt sich an ihnen kein Symptom ermitteln, das für Tuberkulose spräche." „Es handelt sich dabei vielfach um ältere Kühe, gelegentlich auch um solche mittleren Alters. Die Tuberkulinreaktion dieser Tiere liegt z. T. im Grenzgebiet zwischen positiv und negativ, z. T. ist sie völlig negativ."

Nach Haupt (11) verdient der Hinweis, daß Nichtreagenten klinisch völlig unverdächtig sein können, vollste Beachtung. Nach eigenen Erfahrungen dieses Autors hat ein Besitzer ältere Nichtreagenten des Altbestandes zu tuberkulosefreien Färsen gestellt, wodurch diese neu zugekauften Tiere mit Tuberkulose angesteckt wurden.

Manninger (12) weist darauf hin, daß es vom Zeitpunkt des Infektionseintrittes an 8—51 Tage, meistens jedoch weniger als 3 Wochen dauern kann, bis die Ansteckung zu einem allergischen Zustand führt. Somit muß nach etwa 8 Wochen jeweils eine Nachtuberkulinisierung erfolgen. Abgesehen davon vermögen bereits stark abgemagerte Tiere auf Tuberkulin überhaupt nicht mehr zu reagieren (Anergie). Werden infizierte Tiere durch zeitlich zu kurz aufeinander folgende Impfungen desensibilisiert, so vermögen auch sie für etwa 3 Wochen nicht mehr zu reagieren. Leider kommen auf diese Weise oft Seuchenträger in einen tuberkulosefreien Bestand. Das Gleiche gilt für Tiere mit einem geringgradigen, zeitlich ruhenden, tuberkulösen Herd, welche auf die Tuberkulinprobe negativ reagieren. Bei solchen Rindern kann es in Hungerjahren, durch Klimawechsel oder sonstige Umweltschädigungen zum Aufflackern der Krankheit kommen. Eine zeitliche Hypergie oder Anergie kann fernerhin bei Hochträchtigkeit, im Puerperalstadium, nach Transporten usw. auftreten.

Zweifelhafte bis positive Reaktionen können bedingt sein durch heteroallergische Zustände im Zusammenhang mit Paratuberkulose oder Brucellose. Ebenfalls können Infektionen mit (für das Rind apathogenen) humanen oder aviären Tuberkelbakterien die gleichen hetero-allergischen Ergebnisse bedingen (Lang, 14).

Um die Fehlerquelle der allergischen Reaktion abzustellen, wurde versucht, die Tuberkulose auf serologischem Wege zu diagnostizieren.

Beller (1) erzielte mit der Komplementsbindungsmethode verschiedene Ergebnisse, je nachdem, welches Antigen er dazu verwandte. Die besten Ergebnisse lieferte das Besredka-Antigen. Beller nimmt an, daß die Ergebnisse dieser Methode nicht so sehr die Vorgänge im infizierten Parenchym, als im Blut und insbesondere in den Lymphbahnen des Körpers wiederspiegeln.

J. B. Meier (zit. nach Beller, 1) untersuchte 300 Schlachtrinder mit der Komplementsbindungsmethode. 201 dieser Tiere erwiesen sich bei der Schlachtung als tuberkulös. Von den 99 freien Tieren ergaben 3 eine positive Reaktion, während von den 201 makroskopisch untersuchten Tieren nur 116 (52,7 %) eine positive Reaktion zeigten. Meier glaubt, durch den Vergleich mit den Schlachtbefunden folgern zu dürfen, daß die positiven Reaktionen sich hauptsächlich auf Tiere mit aktiven, tuberkulösen Prozessen beziehen.

Zeller (30) führte vergleichende Untersuchungen mittels der Tuberkulinprobe und Komplementbindungsmethode durch. Positiv war die Komplementbindungsmethode bei 63,6 %, negativ bei 27,59 % und zweifelhaft bei 8,9 %. Eine Übereinstimmung beider Proben konnte er nur bei 60,3 % der Fälle erzielen. Nur in ganz wenigen Fällen war Schlachtbefund und Komplementsbindungsprobe positiv, während die Tuberkulinprobe negativ war.

Nach Buß (3) bringt die Meinicke-Tuberkulose-Reaktion, als Trockenblut- bzw. Trockenblutserumreaktion angewandt, bessere Ergebnisse. Diese Methoden arbeiten nicht als Zentrifugier- bzw. Kuppenmethoden, wobei schwächere Ausflockungen makroskopisch unbeobachtet bleiben können, sondern die Reaktionen werden makroskopisch verfolgt. Diese Methoden fußen auf Reaktionen, welche von Meinicke (15), Dahr (7) und anderen Autoren zur Diagnose der Tuberkulose und Syphilis in die Humanmedizin eingeführt wurden. Meinicke (15) hat durch verschiedene Untersuchungen bewiesen, daß es sich bei der Trockenblutreaktion um eine Antigen-Antikörperreaktion handelt. Er stellte fest, daß bei Frischinfizierten die Reaktion oft negativ ausfällt, da noch nicht genügend Antikörper gebildet seien. Bei länger bestehenden Erkrankungen fand er dagegen die stärksten positiven Ergebnisse. Wenn jedoch nach Abheilung des Krankheitsprozesses keine Bakterienstoffe mehr resorbiert werden, so verschwinden die Antikörper aus dem Blut, und die Reaktion wird nach Meinicke negativ. Der positive Ausfall der Probe zeigt demnach eine aktive oder zumindest eine das aktive Stadium noch nicht lange überstandene Tuberkulose an, bei der sich die Antikörper noch eine gewisse Zeit im Blute halten.

Buß und Lang (6) untersuchten zunächst in drei Großversuchen 821 Rinder, von denen 644 auf Tuberkulin positiv reagierten. Mit der Trockenblutmethode erzielten sie in 581 Fällen = 90,2 % eine Übereinstimmung. 33 Tiere waren übereinstimmend negativ und weitere 144 tuberkulinnegativ, aber serologisch positiv.

An Hand zahlreicher Schlachtungen von Tieren mit anergischer Reaktion wurde erwiesen, daß die serologisch positive Reaktion mit dem Schlachtbefund übereinstimmte.

Schlossarek (23) hat insgesamt 207 Blutproben von Rindern mittels der Trockenblutreaktion untersucht. 100 Proben stammten von Schlachttieren, bei denen am hiesigen Schlachthof der pathologisch-anatomische Befund festgestellt werden konnte. In 83 % der Fälle stimmten die Ergebnisse der serologischen Methode mit dem Schlachtbefund überein, 16 Tiere waren serologisch negativ bei positivem Schlachtbefund, und in einem Fall war der Schlachtbefund negativ bei positiver Reaktion.

Die restlichen 107 Blutproben wurden von lebenden Rindern entnommen, welche intrakutan tuberkulinisiert worden waren. In 77,6 % der Fälle waren beide Proben übereinstimmend. 11,2 % der Tiere zeigten eine positive Tuberkulinprobe bei negativem serologischen Befund, und bei den restlichen 11,2 % ergab sich ein umgekehrtes Ergebnis.

Auch Overbeck (20) stellte Untersuchungen mit der Trockenblutmethode im Vergleich mit der Tuberkulinprobe an. In 73,8 % stimmten die Ergebnisse beider Proben überein. Bei 11,9 % der Rinder war die Trockenblutreaktion positiv und die Tuberkulinprobe negativ, und bei 14,2 % der Fälle war es umgekehrt.

Müller (17) untersuchte nun, ob analog der Trockenblutreaktion eine Trockenmilchserumreaktion zur Diagnostik der Tuberkulose geeignet sei. Er untersuchte die Milch von 60 Kühen, welche auf Grund des Schlachtbefundes zu 60 % eine Tuberkulose aufwiesen. Von diesen 60 Kühen lag bei 14 Tieren pathologisch-anatomisch eine Eutertuberkulose vor. In diesen 14 Fällen stimmte das Reaktionsergebnis zu 100 % mit dem Schlachtbefund überein. Bei 22 organtuberkulösen Tieren ergaben die Reaktionen mit angetrocknetem Milchserum in 95,4 % der Fälle ein übereinstimmendes Ergebnis mit dem Schlachtbefund. Bei den 24 pathologisch-anatomisch tuberkulosefreien Tieren lag nach den Reaktionsergebnissen in 20,9 % der Fälle eine Infektion vor. Hier bestand also eine Übereinstimmung in 79,1 % der Fälle. Zählt man die Ergebnisse der drei Untersuchungsreihen zusammen, so ergibt sich eine Übereinstimmung zwischen Schlachtbefund und Trockenmilchserumreaktion von 91,65 %. Bei 11,66 % lag eine positive Reaktion bei negativem Schlachtbefund vor, während es in 1,69 % der Fälle umgekehrt war.

Gleichfalls stellte Müller (17) vergleichende Untersuchungen mittels der intrakutanen Tuberkulinprobe und der Trockenmilchserumreaktion an. Bei 73,8 % der Fälle stimmten beide Proben überein, in 22 % der Fälle war die Intrakutanprobe negativ, während die Trockenmilchserumreaktion positiv verlief, und bei 4,2 % der Fälle war es umgekehrt.

Erwähnenswert ist noch ein Fall, den Kaspar (13) berichtet, bei welchem pathologisch-anatomisch eine Tuberkulose der Lunge, Leber, Milz und Nieren vorlag, die Intrakutanprobe sowie die Trockenblutserumreaktion versagte. aber die serologische Milchuntersuchung ein positives Ergebnis brachte.

Buß (4) hat auch eine Trockenblut- bzw. Trockenblutserumreaktion zur Diagnose der Brucellose veröffentlicht und empfiehlt diese für Bestandsuntersuchungen.

Weinberg (27) hat 1950 diese Untersuchungensverfahren überprüft und eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse mit der bekannten Langsamagglutination und Meinicke-Flockungsreaktion gefunden.

Dinslage (8) hat oben erwähnte Verfahren auf Trockenmilch bzw. Trockenmilchserum ausgedehnt und die Langsamagglutination als Kontrolle zur Anwendung gebracht. Bei 168 untersuchten Fällen wurde in 97,6 % ein übereinstimmendes Ergebnis erzielt.

Kaspar (13) untersuchte 198 Tiere mittels Langsamagglutination und Trockenmilchserumreaktion. Er fand eine Übereinstimmung der Ergebnisse bei 184 Fällen = 92,93 %. Von 14 durch die Langsamagglutination positiv befundenen Fällen konnten jedoch nur 8 = 57.14 % durch die Trockenmilchserumreaktion ermittelt werden.

C. Eigene Untersuchungen.

I. Untersuchungsmaterial.

Zur Verfügung standen mir sämtliche laktierenden Tiere der Gemeinde H. Die Tiere waren listenmäßig erfaßt und durch die Ambulatorische Veterinärklinik in Gießen tuberkulinisiert worden. Die Ergebnisse der Tuberkulinisierung wurden mir vom Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde zur Verfügung gestellt.

Nach Auftragung der jeweiligen Ohrmarkennummer und Listennummer auf die zur Verfügung gestellten Milchfläschchen wurden die Milchproben (Einzelgemelke) von den entsprechenden Kühen entnommen und in das Institut für tierärztliche Nahrungsmittel gebracht, wo sie bis zur Verarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

Gewinnung des Serums.

a) für die Trockenmilchserumreaktion auf Tuberkulose,
b) für die Trockenmilchserumreakiion auf Brucellose,
c) für die Langsamagglutination als Kontrolle zu b.

Von jeder gut durchgeschüttelten Milchprobe wurden 20 ccm Milch bei 2000 Umdrehungen pro Minute 30 Minuten lang zentrifugiert, das oben angesammelte Fett sorgfältig entfernt und die verbleibende Magermilch in ein Becherglas gebracht. Diese Magermilch erhielt zur schnelleren Gerinnung einen Zusatz von 2 Tropfen Labessenz, wurde gut durchgeschüttelt und dann in den Brutschrank gestellt. Nach etwa 2 Stunden war die Milch meistens geronnen, das Serum wurde abfiltriert, und auf zwei numerierte Objektträger wurde jeweils auf eine Hälfte ein großer Tropfen des Serums gleichmäßig verteilt. Innerhalb von zwei Stunden war das Serum bei Zimmertemperatur stets angetrocknet. Während ein Objektträger zur Untersuchung auf Tuberkulose gebraucht wurde, diente der andere zur Untersuchung auf Brucellose. Der Rest des Serums wurde für die Langsamagglutination aufbewahrt.

II. Trockenmilchserumreaktion auf Tuberkulose.

Benötigtes Material und Reagentien:

1. Petrischalen zum Herstellen der Feuchtkammern
2. Glatte Objektträger
3. Doppel-Hohlschliffobjektträger
4. Reagenz- und Bechergläser
5. 10 ccm- und 1 ccm-Pipetten
6. Ein Thermometer
7. 3,5%ige Kochsalzlösung aus Natrium chloratum pro analysi und destilliertem Wasser. Die gebrauchsfertige Lösung darf nicht älter als 3 Tage sein.
8. Alkoholisches Tuberkuloseantigen nach Meinicke
9. Wässeriges Tuberkuloseantigen, konzentriert, nach Meinicke

10. Original - Standard - Extrakt für Prof. Meinickes Klärungsreaktion (MKR).

Ausführung der Reaktion.

Zum Zwecke der Antikörpergewinnung werden auf das angetrocknete Milchserum 0,1 ccm 3,5%ige NaCl-Lösung gegeben und mit der Kante eines Objektträgers sorgfältig zu einem dünnen Film ausgestrichen. Das angefeuchtete Präparat kommt sodann für eine halbe Stunde in eine feuchte Kammer. welche folgendermaßen hergestellt wird: Der Boden einer Petrischale wird mit Filtrierpapier ausgelegt und dann mit Wasser benetzt. Um den Objektträger wieder leicht herausholen zu können, und um ein lästiges Feuchtwerden auf der Unterseite zu verhüten, wird ein einfacher Objektträger auf das feuchte Filtrierpapier gelegt, auf dem dann der Objektträger mit dem Ausstrich liegt. Damit eine gleichmäßige Extraktion der Antikörper gewährleistet ist, muß darauf geachtet werden, daß die Objektträger waagerecht in der feuchten Kammer liegen, da sich andernfalls die NaCl-Lösung an einer Stelle ansammelt.

Während das Präparat in der feuchten Kammer ist, erfolgt die Herstellung des Antigen-Extraktgemisches, indem man in 4 Reagenzröhrchen die Meinicke-Antigene und 3,5%ige NaCl-Lösung in folgender Reihenfolge pipettiert:

Röhrchen I:
Meinickes alkohol. Tuberkuloseantigen . . . . . 0,5 ccm
Röhrchen II:
Meinickes wässeriges Tuberkuloseantigen . . . . . 0,25 ccm
plus 3,5%ige NaCl-Lösung . . . . . 4,75 ccm
Röhrchen III:
Meinickes Standard-Extrakt . . . . . 0,5 ccm
Röhrchen IV:
3,5%ige Na-Cl-Lösung . . . . . 5,0 ccm

Diese vier Reagenzröhrchen werden nun 5 Minuten in ein doppeltes Wasserbad mit einer Temperatur von 55° — 56° C gebracht. Ein Thermometer wird in ein mit 5 ccm Wasser gefülltes Reagenzröhrchen gebracht und gleichfalls ins Wasserbad gestellt. Es ist darauf zu achten, daß die Temperatur von 56° C nicht überschritten wird, und der Flüssigkeitsspiegel des Wasserbades über dem der Lösungen steht, damit eine gleichmäßige Erwärmung garantiert ist. Nach dem vorgeschriebenen Aufenthalt im Wasserbad gießt man den Inhalt vom 2. Reagenzröhrchen in das 1. Röhrchen und mischt gründlich durch mehrmaliges Umgießen. Das gleiche geschieht mit Röhrchen 4 und 3. Röhrchen Nr. 1 enthält nun das „Tuberkulose-Antigen" und Röhrchen Nr. 3 das „Kontroll-Antigen". Diese beiden Reagenzröhrchen werden zum Nachreifen für weitere 2 Minuten in ein Wasserbad von 56° C gebracht. Die Antigene sind dann für die Vornahme der Untersuchung gebrauchsfertig.

Nach Buß (3) hat es sich als günstig erwiesen, während der Untersuchung die „Antigene" bei einer Temperatur von ca. 37 — 40° C zu halten

und dabei auf Ausflockungen zu achten. Treten Ausflockungen auf, so sind die „Antigene" nicht mehr zu verwenden.

Nachdem der Objektträger mit dem angetrockneten Milchserum und der überschichteten NaCl-Lösung eine halbe Stunde in der feuchten Kammer verbracht hat, beginnt die Übertragung der NaCl-Lösung, welche nunmehr die Antikörper enthält, auf inzwischen numerierte Doppelhohlschliffobjektträger. Mit der Ecke eines sauberen Objektträgers wird von dem gelösten Serum jeweils ein Tropfen in die Vertiefungen des Doppelhohlschliffobjektträgers gebracht, von denen der eine zum Haupt- und der andere zum Kontrollversuch dient. Zu dem Tropfen, der zum Hauptversuch dient, wird nun 0,03 ccm „Tuberkulose-Antigen" und zu dem anderen 0,03 ccm „Kontroll-Antigen" zugesetzt. Man benutzt dazu eine Pipette, die gerade eine solche Menge abtropfen läßt. Durch Schütteln und leichtes Klopfen mit dem Finger an den Doppelhohlschliffobjektträger mischt man die beiden miteinander reagierenden Flüssigkeiten und legt darauf die Präparate in die feuchte Kammer zurück.

Die Ablesung der Reaktion erfolgt nach 15 Minuten mit dem Mikroskop bei 50facher Vergrößerung ohne Kondensor. Nach dem Ablesen des Ergebnisses kommen die Doppelhohlschliffobjektträger sofort wieder in die feuchte Kammer; Die zweite Ablesung erfolgt nach 30 Minuten, die dritte nach 45 Minuten und die letzte nach 60 Minuten. Bei den Untersuchungen wird jeweils Hauptversuch (mit Tuberkulose-Antigen angesetzt) und Kontrollversuch (mit Kontroll-Antigen angesetzt) verglichen. Das Ergebnis ist negativ (—), wenn man im ganzen Gesichtsfeld feine grauschwarze Körnchen sieht. Befinden sich jedoch im Hauptversuch dunkle und schwarze Schollen, während bei der Kontrolle keine Reaktion sichtbar ist, liegt ein positives (+) Ergebnis vor. Je nach Stärke der Reaktion nehmen diese gezackten Schollen bei den einzelnen Ablesungen an Zahl und Größe zu und können sich über das gesamte Gesichtsfeld ausbreiten. Als zweifelhaft (V) wird die Reaktion bezeichnet, wenn nur einige, sehr schwache Ausflockungen vorhanden sind.

Reagieren Hauptversuch und Kontrollversuch positiv, so kann eine andere Infektionskrankheit vorliegen. Diese Fälle werden gleichfalls mit „V" = Verdacht, bezeichnet.

Schmutzpartikelchen sind durch ihre unregelmäßige Form und ihr hellgraues oder bräunliches Aussehen von einer positiven Reaktion zu unterscheiden. Außerdem sammeln sie sich wegen ihrer Schwere an der tiefsten Stelle des Hohlschliffes an.

III. Technik und Durchführung der Trockenmilchserumreaktion auf Brucellose.

Zur Untersuchung der Milch auf Brucellose wurde neben der Trockenmilchserumreaktion die Langsamagglutination zur Kontrolle angewandt.

a) Benötigtes Material und Reagentien.

1. Petrischalen zum Herstellen der Feuchtkammern
2. glatte Objektträger
3. Hohlschliffobjektträger
4. Reagenz- und Bechergläser
5. 10 ccm- und 1 ccm-Pipetten
6. ein Thermometer
7. Meinicke Originalextrakt (für Prof. Meinickes Abortus-Bang-Reaktion)
8. Bakterienextrakt (aus Trocken-Antigen hergestellt)
9. 3,5%ige Kochsalzlösung.

b) Durchführung der Reaktion:

Zur Bereitung des Antigens werden 3 Reagenzröhrchen bereitgestellt und mit einer Pipette in folgender Weise beschickt:

Röhrchen I:

1,0 ccm Meinicke Originalextrakt (für Meinickes Abortus-Bang-Reaktion).

Röhrchen II:

9,9 ccm 3,5%ige NaCl-Lösung und 0,1 ccm Bakterienextrakt (aus Trocken-Antigen hergestellt).

Röhrchen III dient zur Aufnahme eines Thermometers in Aqu. font.

Diese drei 3 Reagenzröhrchen werden in ein doppeltes Wasserbad gebracht, bis auf 56° C erhitzt und 8 Minuten lang auf dieser Temperatur gehalten. Ein Überschreiten der Temperatur darf nicht erfolgen, da schon eine Erhöhung von 1° C das Antigen reaktionslos machen kann. Nach Ablauf von 8 Minuten werden die Inhalte von Röhrchen I und II gründlich gemischt und zum Nachreifen für 2 Minuten wieder in ein Wasserbad von ca. 50—56° C gestellt. Es ist zu empfehlen, das Antigen während der Untersuchungen auf einer Temperatur von 37—40° C zu halten. Treten Ausflockungen auf, so ist das Antigen nicht mehr zu verwenden. Nun wird das Trockenmilchserumpräparat mit einem Tropfen 3,5%iger NaCl-Lösung überschichtet und einer Einwirkzeit von 5 Minuten ausgesetzt. Nach Ablauf der 5 Minuten wird mit einer Ecke eines sauberen Objektträgers ein Tropfen der überschichteten NaCl-Lösung, welche in positiven Fällen die Antikörper enthält, in den Hohlschliff eines numerierten Objektträgers gebracht. Dort wird ihm 0,03 ccm der vorbereiteten Antigen-Extrakt-Mischung zugegeben. Nach gründlicher Mischung — am besten durch Schütteln und Stoßen mit Finger an die Kante des Objektträgers — wird der Hohlschliffobjektträger in die feuchte Kammer verbracht. Nach 15 Minuten Aufenthalt in der feuchten Kammer wird das Präparat erstmalig unter dem Mikroskop bei 50facher Vergrößerung ohne Kondensor untersucht. Eine zweite und letzte Untersuchung erfolgt nach weiteren 15 Minuten. Die Beurteilung der Reaktion erfolgt analog der vorher beschriebenen Beurteilung des Reaktionbildes bei Tuberkulose. Die meisten Präparate zeigten schon bei der ersten Betrachtung ein einwandfreies positives bzw. negatives Bild. Bei der zweiten Besichtigung hatte die Reaktion meist noch an Deutlich-

keit zugenommen und bei einigen Präparaten, die zuerst zweifelhaft erschienen, konnte die endgültige Diagnose sicher gestellt werden.

IV. Untersuchung auf Brucellose mit der Langsam-Agglutination.

Für jede Untersuchung werden 4 Agglutinationsröhrchen, mit der Nummer des Versuches versehen, in ein Gestell gebracht. In Röhrchen Nr. 1 kamen 1,6 ccm, in Röhrchen 2, 3 und 4 jeweils 1 ccm physiologischer NaCl-Lösung. Zu Röhrchen 1 kamen dann 0,4 ccm Milchserum, so daß eine Verdünnung 1 : 5 bestand. Nach gründlicher Mischung wurde von Röhrchen 1 1 ccm in Röhrchen 2, von Röhrchen 2 1 ccm in Röhrchen 3 und von Röhrchen 3 1 ccm in Röhrchen 4 überpipettiert. Von Röhrchen 4 wurde 1 ccm abpipettiert und weggegossen.

Somit waren die Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 vorhanden. Zu jedem Röhrchen wurde 0,03 ccm „Brucellose-Antigen der Behringwerke-Marburg gegeben. Nach gründlichem Schütteln wurden die Röhrchen für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Danach erfolgte die Ablesung. Geachtet wurde dabei:

1. auf eine Klärung der überstehenden Flüssigkeit,
2. eine Schleierbildung am Boden des Agglutinationsröhrchens.

Negativ „—" wurde die Reaktion bezeichnet, wenn keine Klärung und keine Schleierbildung bestand. Ein schwacher Schleier ohne wesentliche Klärung der überstehenden Flüssigkeit wurde mit „V" und eine schwache Klärung mit Schleierbildung mit „+" bezeichnet.

Da es sich bei den Untersuchungen um Einzelgemelke handelte, sind Tiere mit einem positivem Titer von 1 : 5 als verdächtig „V" und solche mit einem posittvem Titer von 1 : 10 als positiv „+" zu bewerten.

Bei der Überprüfung der 220 Versuchsreihen wurden vergleichsweise folgende Ergebnisse festgestellt:

1. Untersuchung auf Tuberkulose.

a) Tuberkulinprobe:		b) Trockenmilchserum-Reaktion:	
positiv	= 74	positiv	= 95
negativ	= 122	negativ	= 110
Verdacht	= 24	Verdacht	= 15

2. Untersuchung auf Brucellose.

a) Langsamagglutination:		b) Trockenmilchserum-Reaktion:	
positiv	= 18	positiv	= 11
negativ	= 190	negativ	= 185
Verdacht	= 12	Verdacht	= 24

Eine genaue Aufstellung der Versuchsanordnung ist auf Wunsch über die Universitätsbibliothek Gießen zu erhalten.

V. Untersuchungsergebnisse.

a) Auswertung der Tabellen.

1. Tuberkulose.

Intrakutanprobe und Trockenmilchserumreaktion von 220 laktierenden Kühen hatten im Vergleich nachstehende Ergebnisse:

	Zahl der Fälle	Prozentsatz
übereinstimmend positv	65	29,54
„ negativ	90	40,91
„ zweifelhaft	7	3,18
tuberkulinzweifelhaft; TMSR-positiv	6	2,73
tuberkulinzweifelhaft; TMSR-zweifelhaft	8	3,64
tuberkulinzweifelhaft; TMSR-negativ	11	5,0
tuberkulinpositiv; TMSR-negativ	9	4,09
tuberkulinnegativ; TMSR-positiv	24	10,91
Untersuchte Fälle	100	100,0

Bei 162 Ergebnissen = 73,63 % besteht Übereinstimmung zwischen Tuberkulinprobe und Trockenmilchserumreaktion. 6 Tiere = 2,73 % zeigten eine zweifelhafte Tuberkulinprobe und eine positive Trockenmilchserumreaktion. Wenn diese Tiere als positiv bezeichnet werden, erhöhen sich die übereinstimmenden Fälle auf 168 = 76,36 %.

Bei 11 Kühen war die Tuberkulinprobe zweifelhaft und die Trockenmilchserumreaktion negativ und bei 8 Kühen die Tuberkulinprobe negativ und die Trockenmilchserumreaktion zweifelhaft. Bei diesen Fällen läßt sich ein abschließendes Urteil nicht fällen, da eine Sektion nicht stattgefunden hatte.

Tuberkulinpositiv mit negativer Trockenmilchserumreaktion reagierten 9 Tiere. Diese Fälle sind als Versager der Trockenmilchserumreaktion anzusehen.

24 Kühe zeigten eine positive Trockenmilchserumreaktion und ein negatives Ergebnis der Tuberkulinprobe. Hier kann es sich z. T. um Tiere handeln, die trotz negativer Tuberkulinprobe tuberkulös erkrankt waren. Nach Müller (17) stimmt die Trockenmilchserumreaktion in 91 % der Fälle mit der Trockenblutreaktion überein. Die Trockenblutreaktion hinwieder ist in ihrem positiven Ausfall als beweisend für das Bestehen einer tuberkulösen Infektion anzusehen.

Kaspar berichtet außerdem von einem hochgradigen, tuberkulösen Schlachtbefund bei negativer Tuberkulin- und Trockenblutreaktion und positiver Trockenmilchserumreaktion.

2. Brucellose.

Die Auswertung der Tabellen in Bezug auf Brucellose ergibt folgendes Bild:

	Zahl der Fälle	Prozentsatz
übereinstimmend positiv	7	3,18
„ negativ	171	77,73
„ zweifelhaft	4	1,82
Langsamagglutination-positiv; TMSR-zweifelhaft	3	1,36
Langsamagglut.-zweifelhaft; TMSR-positiv	2	0,91
Langsamagglut.-zweifelhaft; TMSR-negativ	6	2,73
Langsamagglut.-negativ; TMSR-zweifelhaft	17	7,73
Langsamagglut.-positiv; TMSR-negativ	8	3,63
Langsamagglut.-negativ; TMSR-positiv	2	0,91
Untersuchte Fälle	220	100,0

Faßt man die übereinstimmenden und gleichgerichteten (positiv-zweifelhaften) Reaktionen zusammen, so ergibt sich eine Übereinstimmung der Langsamagglutination mit der Trockenmilchserumreaktion bei 187 Fällen = 85 %.

Bei 23 Fällen war eine der Reaktionen zweifelhaft und die andere negativ, während in zwei Fällen die Trockenmilchserumreaktion positiv war und die Langsamagglutination negativ.

Bei 8 Tieren war die Langsamagglutination positiv und die Trockenmilchserumreaktion negativ. Hier wird es sich um Versager der Trockenmilchreaktion handeln, da bisher die Langsamagglutination als sicherste Methode zur Feststellung der Brucellose in der Milch zu bewerten ist.

Obwohl mit 85% Übereinstimmung ein gutes Ergebnis erzielt worden ist, ist die Trockenmilchserumreaktion für Einzeluntersuchungen auf Brucellose weniger geeignet, da sie bei 220 Fällen 8 durch die Langsamagglutination als positiv ermittelte Fälle als vollkommen negativ erkennen ließ.

b) Zusammenfassung.

1. Trochenmilchserumreaktion zur Ermittlung der Tuberkulose:

Aus vorstehenden Untersuchungen ergibt sich, daß die Tuberkulinprobe mit der Trockenmilchserumreaktion in 73,6% übereinstimmende Ergebnisse bringt. Diese Prozentzahl deckt sich annähernd mit den Ergebnissen, welche von anderen Autoren bei der Durchführung der Trockenblut- bzw. Trockenblutserumreaktion erzielt wurden. Hieraus kann geschlossen werden, daß anstelle der Trockenblut- bzw. Trockonblutserumreaktion die Trockenmilchserumreaktion zur serologischen Diagnose der Tuberkulose herangezogen werden kann.

Da bei zweifelhaft ausfallender Tuberkulin-Reaktion in einigen Fällen die Trockenmilchserumreaktion ein positives Ergebnis brachte, ist die Annahme nicht unberechtigt, daß diese Tiere ebenfalls tuberkulös infiziert sind.

2. Trockenmilchserumreaktion zur Ermittlung der Brucellose:

Wie die Untersuchung auf Brucellose zeigt, stimmen die Ergebnisse der Trockenmilchserumreaktion mit denen der Langsamagglutination in 85% überein. In 3,63% liegt offensichtlich ein Versagen der Trockenmilchserumreaktion vor. Da die Langsamagglutination als beweisend für eine

stattgehabte Infektion angesehen werden muß, kann die Trockenmilchserumreaktion nicht für Einzeluntersuchungen herangezogen werden.

VI. Schlußbetrachtung.

a) Tuberkulose.

Die Trockenmilchserumreaktion auf Tuberkulose bringt in 73,6% eine völlige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Tuberkulinisierung. In diesen Fällen ist rückschließend auf das vorliegende Schrifttum eine Infektion des betreffenden Tieres in Frage zu ziehen. In Fällen, in welchen die einmal vorgenommene allergische Probe zweifelhaft, die serologische Untersuchung aber positiv ausfällt, gilt das vorher Gesagte ebenfalls.

In Fällen, bei denen die Tuberkulinreaktion zweifelhaft ist, die Trockenmilchserumreaktion aber negativ ausfällt, ebenso wie bei tuberkulinpositiven Tieren, bei welchen die Trockenmilchserumreaktion ein negatives Ergebnis gebracht hat, ist mit einem Versagen dieser serologischen Reaktion zu rechnen. Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen handelt es sich um rund 9%, ein Prozentsatz, der von anderer Seite auch bei Durchführung der Trockenblut- bzw. Trockenblutserumreaktion als Versager angegeben wird.

Es ergibt sich hieraus, daß anstelle der Trockenblutreaktion bzw. der Trockenblutserumreaktion auch die Trockenmilchserumreaktion zur Diagnose der Tuberkulose Anwendung finden kann. Insbesondere bei zweifelhaften und negativen Ergebnissen der Tuberkulinreaktion kann mittels der Trockenmilchserumreaktion eine eventuell vorliegende tuberkulöse Infektion bei Kühen erkannnt werden. Die Trockenmilchserumreaktion kann als Ergänzung der Tuberkulinisierung herangezogen werden.

b) Brucellose.

Die Trockenmilchserumreaktion zur Ermittlung der Brucellose-Infektion bringt mit der Milchserum-Langsamagglutination in 85% der Fälle ein übereinstimmendes Ergebnis. Auf Grund der durchgeführten Untersuchungen liegt in 3,63% ein offensichtliches Versagen dieser serologischen Methode gegenüber der Langsamagglutination vor. Da die Langsamagglutination als sicherste Methode zur Diagnose der Brucellose-Infektion angesehen werden muß, eignet sich die Trockenmilchserumreaktion auf Brucellose nicht zur Untersuchung von einzelnen Tieren, kann aber bei Bestandsuntersuchungen, insbesondere bei großen Beständen, wegen der Schnelligkeit ihrer Durchführbarkeit günstige Übersichtsergebnisse über eine eventuelle Verseuchung bringen.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem hochgeschätzten Lehrer, Herrn Professor Dr. Keller, für die freundliche Überlassung des Themas zu danken.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. W. Buß und Herrn Dr. K. Lang für das stetige Entgegenkommen und die Unterstützung, die sie mir bei der Anfertigung der Arbeit zuteil werden ließen, danken.

Literaturverzeichnis

1. Beller: Untersuchungen über den serologischen Nachweis der Tuberkulose des Rindes. II. Die Leistungsfähigkeit der serologischen Methoden. (Archiv f. w. u. prakt. Tierheilkunde, 58, 213, 22, 1928.)
2. Blindow: Untersuchungen über den Tuberkelbakteriengehalt kurzerhitzter Handelsmilch. (Vet. Diss. Gießen 1951.)
3. Buß: Die serologische Diagnose der Rindertuberkulose mit angetrocknetem Blut bzw. mit angetrocknetem Blutserum. (Der Lebensmitteltierarzt, 1, 7, 1950.)
4. — Eine Trockenserum- und Trockenblut-Reaktion zur Diagnose der Brucellen-Infektion. (Wissenschaft und Praxis, 1, 52, 1950.)
5. — (Der Lebensmitteltierarzt, 1, 97, 1950.)
6. Buß und Lang: Rindertuberkulose und Milchhygiene. (Der Lebensmitteltierarzt, 1, 52, 1950.)
7. Dahr, P.: Die Luesdiagnose mit einem angetrockneten Tropfen Blut. (DTW 60, 94, 1934.)
8. Dinslage: Untersuchungen über eine Trockenmilch- und Trockenmilchserumreaktion zur Diagnose der Brucellose. (Vet. Diss. Gießen 1951.)
9. Eikmeier: Untersuchungen über den Tuberkelbakteriengehalt hocherhitzter Molkereimilch. (Vet. Diss. Gießen 1950.)
10. Grüll: Untersuchungen über hitzeresistente Tuberkelbakterienstämme. (Vet. Diss. Gießen 1951.)
11. Haupt: (Mtschr. f. prakt. Tierheilk., 4. 265, 1952.)
12. Hutyra-Marek-Manninger: Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere. I. Band, Infektionskrankheiten. (Verlag Gustav Fischer, Jena, 1945.)
13. Kaspar: Untersuchung auf Tuberkulose und Brucellose mit Hilfe der Intrakutanprobe und verschiedener serologischer Untersuchungsverfahren. (Vet. Diss. Gießen 1950.)
14. Lang: Wesen und Bedeutung der Tuberkulin-Alergie beim Rinde. (Berliner und Münchner tierärztl. Wochenschrift 1950/8/149.)
15. Meinicke: Eine neue Serumreaktion auf Tuberkulose. (Klin. Wschr. 13, 833, 1934.)
16. Moore: The Eradication of Bovine Tuberculosis from isolated centres. (Vet. med. 1948/43/17.)

17. Müller: Untersuchungen über eine Trockenmilchserumreaktion zur Feststellung der Rindertuberkulose. (Vet. Diss. Cießen 1951.)
18. Müller: Untersuchungen über die Verbreitung der Rindertuberkulose in Gemeinden und einzelnen Beständen in Hessen und Vorschläge zu deren Bekämpfung. (Vet. Diss. Gießen 1952.)
19. Munz: Untersuchungen über den Tuberkelbakteriengehalt kurzzeiterhitzter Molkereimilch mit Hilfe der Zentrifugiermethode, der Alkoholprobe und der Züchtung auf Petragnani-Nährböden, modifiziert nach Witte. (Vet. Diss. Gießen 1949.)
20. Overbeck: Die Trockenblutmethode zur Feststellung der Tuberkulose im Vergleich mit dem pathologisch-anatomischen Befund und der Intrakutanprobe. (Vet. Diss. Gießen 1950.)
21. Role: Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre. (Enke-Verlag Stuttgart 1949, S. 138.)
22. Seelemann und Pilz: (Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsberichte, Bd. III, 509, 1951.)
23. Schlossarek: Eine Trockenblutreaktion zur Feststellung der Rindertuberkulose. (Vet. Diss. Gießen 1950.)
24. Schönberg: Klimmer-Schönberg, Milchkunde. (Verlagsbuchhandlung Richard Schoetz, Berlin 1947.)
25. Schoop: (Mtschr. f. prakt. Tierheilk., 4, 189, 1952.)
26. Wagener: Das Problem der Rindertuberkulose. (Bericht über die 2. Tagung der freien Vereinigung deutscher Hygieniker und Mikrobiologen vom 22.—27. Aug. 1948 in Stuttgart.)
27. Weinberg: Serologische Diagnose der Rinderbrucellose mit angetrocknetem Blut und angetrocknetem Blutserum. (Vet. Diss. Gießen 1950.)
28. Weyl: Neue Wege zur Bekämpfung der Tuberkulose des Rindes unter Berücksichtigung der Wechselbeziehung Rindertuberkulose—Kindertuberkulose. (Verlag M. und H. Schaper, Hannover 1950.)
29. Wirth-Diernhofer: Lehrbuch der inneren Krankheiten der Haustiere. (Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart 1943.)
30. Zeller: Beitrag zur Diagnose der Rindertuberkulose. (B. T. W., 49 1936, S. 789.)
31. — (B. M. T. W., 52, 3, 1950; Tuberculin and the control of Bovine Tuberculosis.)

Lebenslauf.

Am 13. Februar 1926 wurde ich, Karl Hermann Rödder, als Sohn des Landwirts Heinrich Rödder und seiner Ehefrau Anna, geb. Stahl, in Eichelhardt (Kreis Altenkirchen) geboren.

Ostern 1932 wurde ich in die Volksschule zu Blickhausen aufgenommen und besuchte dieselbe 5 Jahre. Von Ostern 1937 bis 1940 besuchte ich die Oberschule in Wissen (Sieg) und von 1940 bis zur Einberufung im September 1943 das Realgymnasium in Betzdorf. Als Abschluß erhielt ich die Reifeprüfung.

In der Wehrmacht war ich für die aktive Veterinäroffizierlaufbahn angenommen. Infolge der Kriegsentwicklung bin ich jedoch nicht zum Studium gekommen, sondern mußte erst Truppenoffizier werden.

Nach dreimaliger Gefangenschaft kam ich am 23. Mai 1945 aus dem Osten nach Hause.

Von Oktober 1945 ab besuchte ich wieder das Realgymnasium in Betzdorf und bestand dort am 23. Juli 1946 die Reifeprüfung. Nach dem Abitur bis zum April 1947 war ich in der Landwirtschaft tätig und besuchte im Wintersemester 1946/47 die Landwirtschaftsschule Wissen (Sieg).

Im Sommersemester 1947 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen. Nach vier vorklinischen Semestern legte ich am 25. März 1949 dort die tierärztliche Vorprüfung ab und nach weiteren fünf klinichen Semestern am 11. Januar 1952 die tierärztliche Prüfung.

Die Ableistung meines Praktikantenjahres erfolgte an der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Veterinärklinik in Gießen. Nach deren Beendigung erhielt ich die Approbation.